棉蚜获毒后禁食对其保持并传播黄瓜花叶病毒的影响

王 斌，陈建群*，张鹏飞，马 亮，王咏妙
（南京大学生物科学与技术系，南京 210093）

摘要：采用棉蚜 *Aphis gossypii*－甜瓜 *Cumumis melo*－黄瓜花叶病毒（cucumber mosaic virus，CMV）体系，研究棉蚜获毒后在空气中禁食对其保持并传播黄瓜花叶病毒的影响。结果表明获毒后的禁食时间与棉蚜传毒效率呈负相关。运用 EPG（electrical penetration graph）及其即时显示、即时中断技术研究分析棉蚜禁食后的早期传毒行为细节。结果显示：禁食处理没有显著影响电势落差（potential drop，pd）数目及穿刺过程中出现的第一个 pd 波形前穿刺时间这两个重要指标，但禁食处理能引起 pd 波的两个亚波形 pdⅡ-1 和 pdⅡ-2 持续时间的显著减短。进一步分析未禁食棉蚜传毒作用与 pd 亚波形的关系，显示传毒可能与 pdⅡ-2 的持续时间相关（$P = 0.06$）。因此，pdⅡ-2 的持续时间可能是与棉蚜传毒相关的一个行为指标。该研究还建立了新的高效而稳定的获毒方法——5 pd 获毒法，与传统的 5 min 获毒法相比，获毒效率显著提高。

关键词：棉蚜；黄瓜花叶病毒；甜瓜；获毒法；禁食；传毒
中图分类号：Q965 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2003）03-0259-08

Effects of post-acquisition fast on cucumber mosaic virus transmission by the cotton aphid，*Aphis gossypii*

WANG Bin，CHEN Jian-Qun*，ZHANG Peng-Fei，MA Liang，WANG Yong-Miao（Department of Biology，Nanjing University，Nanjing 210093，China）

Abstract：Viruliferous cotton aphids，*Aphis gossypii*，were treated with post-acquisition fast in the air to study cucumber mosaic virus（CMV）retention in the aphid and consequent transmission on the melon，*Cumumis melo*. Transmission efficiency was negatively correlated with fasting duration. The 10-min inoculation processes of fasted and non-fasted aphids were studied with electrical penetration graph（EPG）technique to search the behavior events responsible for the reduction of transmission efficiency. The total number of potential drops and the probing time before the 1st pd were usually considered as two important behavior variables correlated with transmission efficiency；however，no significant difference was found between fasted and non-fasted aphids. Fasting treatment significantly decreased the durations of sub-phase pdⅡ-1 and pdⅡ-2. Further analysis suggested that the duration of pdⅡ-2 was probably a behavioral factor correlated with the virus transmission. The related behavioral mechanism was discussed. The 5 pd acquisition method was first used in virus acquisition research and a significantly higher transmission efficiency（78.6% vs 46.40%，$P < 0.0001$）was obtained compared to the traditional 5 min acquisition method.

Key words：*Aphis gossypii*；cucumber mosaic virus；*Cumumis melo*；virus acquisition method；post-acquisition fast；virus transmission

蚜虫是传播非持久性病毒的第一介体，仅几秒钟就可以完成获毒或传毒过程。但是，蚜虫获得非持久性病毒后的持毒时间（retention time）较短，通常只有数小时。持毒时间随蚜虫和非持久性病毒的不同而变化，较长的持毒时间可使蚜虫在较大的范围内传播植物非持久性病毒。在顺风的情况下，

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39870141，30270252）；教育部优秀年轻教师基金资助项目
作者简介：王斌，男，1978 年 1 月生，江苏淮安人，在读硕士，从事蚜虫传毒机理研究，E-mail：wangbinjs@sina.com
* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：chenjq@nju.edu.cn
收稿日期 Received：2002-06-18；接受日期 Accepted：2003-01-27

蚜虫甚至可以飞越长达 1 600 公里的距离后仍然持有非持久性病毒（Zeyen and Berger，1990），并引起大规模的病害（Zeyen *et al*.，1987；Berger and Ferris，1989）。因此，研究蚜虫获得、保持、丢失和传播非持久性病毒的能力及其内在机理对预测和防止植物病毒病的流行、扩散和爆发具有重要意义。

早期的研究发现：将获得非持久性病毒 BYMV（菜豆黄色花叶病毒）后的桃蚜 *Myzus persicae* 在常温下置于固体表面上禁食时，蚜虫会因试图取食而分泌唾液，病毒粒子伴随吐出，引起病毒丢失（Hashiba and Misawa，1969，1970），使其随后在健康植株上取食时的传毒效率降低。Fereres 等（1992）发现延长蚜虫在病株植物上的获毒时间传毒效率下降，5 min 是最合适的蚜虫获毒饲育时间。更深入的研究通过对蚜虫获毒后取食行为的分析，分别从获毒和接种两个方面证明：蚜虫获毒后可能在随后的取食过程中将病毒丢失在植物组织中。其中，Collar 等（1997）利用 EPG（electrical penetration graph）（Tjallingii，1978）技术研究显示：桃蚜在获得非持久性病毒 PVY（马铃薯 Y 病毒）过程中口针最后一次从植物细胞中退出到离开植物（即在植物细胞间穿刺）的时间长度与最终的获毒率呈负相关。Chen 等（1997）研究发现：传毒过程中在“1st pd 前的穿刺时间”（即在第一次刺破植物活细胞的细胞膜以前，蚜虫口针的穿刺时间）这一行为指标上，传毒成功的棉蚜要显著低于传毒不成功的棉蚜。因此，蚜虫可以将获得的非持久性病毒丢失在固体表面，也可能将其丢失在植物内部，如细胞壁中。但是，获毒蚜虫在空气中（如迁飞过程中）是否会丢失病毒呢？这种与蚜虫持毒能力和植物病毒扩散直接相关的性质至今未见报道。我们通过棉蚜 *Aphis gossypii* 置于空气中禁食来揭示获毒蚜虫在空气中是否会丢失非持久性病毒。

研究蚜虫丢失病毒的过程首先必须了解它是否获毒。长期以来，有关病毒丢失的研究进展缓慢，一个很重要的原因就是无法获得一个高而稳定的获毒率。我们运用 EPG 技术以及先进的即时显示、即时中断装置，探索科学、可靠的蚜虫获毒方法，以获得理想的获毒率。并在此基础上，进一步研究棉蚜获毒后禁食对其保持和传播黄瓜花叶病毒（cucumber mosaic virus，CMV）的影响，以揭示植物非持久性病毒传播的内在机理。

1 材料和方法

1.1 供试虫源

实验用棉蚜为 Ag-NJGh-Cm 品系，1997 年采自南京郊区实验田泗棉 3 号上，在本实验室以甜瓜 *Cumumis melo* 黄金瓜品种饲养。室内饲养环境温度 25 ± 5℃，光周期为 16L∶8D，光照强度 3 000 ~ 4 000 lx。新生若虫饲养一周后用于实验。

1.2 供试植物

选用甜瓜的黄金瓜品种。培养环境同棉蚜，种子萌发后生长 3 ~ 4 周时用于实验。

1.3 病毒株系及病毒培养

选用的黄瓜花叶病毒株系为 CMV-RB，以 $CaCl_2$ 冷冻干燥法保存于 - 80℃冰箱中待用。实验用源毒株的准备：用病株叶片机械接种生长 2 周左右的甜瓜幼苗，1 ~ 2 周后发病的植株用作蚜传 EPG 实验的源毒株（Chen *et al*.，1997）。培养环境同棉蚜。接种供试植株 2 周后观察植株发病情况，根据花叶斑判断植株是否发病。

1.4 EPG 仪器操作与即时中断技术

原理：将蚜虫及其取食的植物接入同一电路，蚜虫的口针作为电极，当口针刺破植物时电路闭合形成回路。在蚜虫取食过程中，蚜虫本身的电阻以及口针所在植物组织或细胞的电位都会发生变化。以时间为横坐标，测量电位 Vi 为纵坐标输出的波形图就是 EPG 的波形记录。

仪器：实验用 EPG 信号放大器系荷兰华赫宁根农业大学昆虫学系研制的 Giga-8 直流放大器。输入阻抗 Ri 为 $10^9\,\Omega$，输出信号经 A/D 卡（DAS-800，Metrabyte）转换后，由计算机接收并记录。数据采集软件使用本实验室编写的软件 Realdisplay 1.0。

蚜虫取食行为的记录和即时中断技术：选取健壮无翅成蚜，将直径 20 μm，长约 4 ~ 6 cm 的金丝用水溶性导电银胶粘在棉蚜的背板上，金丝的另一端接上电极，小心插入放大器的输入插头。实验开始时，将粘有金丝的棉蚜放在供试植株的叶片上。实验记录过程在屏蔽罩中进行。实验时，打开由 Realdisplay 1.0 定义的热键，可将采集到的电信号即时转化显示在电脑屏幕上，我们可实时观察到回路中电信号的变化，当出现待研究波形时，迅速中断棉蚜的取食，对棉蚜的取食行为进行实时人为控制。同时，实验回路中的电信号（EPG 波形）均以数字信号形式存储于硬盘，以供分析。为确保实验

中的人为干扰不损伤棉蚜口针，将中断取食的棉蚜置于另一株植物上，继续记录 EPG 5 min，检验棉蚜是否受损伤。

1.5　棉蚜获毒 5 min 后在空气中禁食不同时间对最终传播黄瓜花叶病毒效率的影响

取无毒成蚜，预饥饿 1 h 后将其置于黄瓜花叶病毒发病明显的黄金瓜叶片上获毒 5 min，然后将棉蚜放在玻璃培养皿中分别禁食 0.5 h、1 h 和 4 h，对照组禁食时间为 0 h，再将棉蚜移至黄金瓜健康植株上于培养箱中接种 3 h。所有接种后的植株都置于温室中，2 周后记录发病结果。

1.6　棉蚜获毒 5 pd 的传毒效率的测定

获毒过程：将无毒成蚜用金丝粘好后，预饥饿 1 h，然后将其置于发病明显的黄金瓜叶片上，同时打开 EPG 记录仪和即时显示系统，开始获毒过程。通过即时显示系统观察到发生 5 次 pd 波（potential drop，表明棉蚜的口针刺破植物细胞膜 5 次）后，立即中断其获毒过程。

接种过程：将上述完成获毒过程的棉蚜迅速移至黄金瓜健康植株上，在培养箱中接种 3 h，一只棉蚜对应于一株植物。接种后的植株都置于温室中，2 周后记录发病结果。

1.7　棉蚜获毒 5 pd 后在空气中禁食不同时间对最终传播黄瓜花叶病毒效率的影响

获毒过程同 1.6。

禁食过程：将完成获毒过程的棉蚜悬挂置于空气中分别禁食 0 h、1 h、2 h 和 4 h。

接种过程：将完成获毒过程并经禁食处理后的棉蚜放在黄金瓜健康植株（Test1）上 10 min，一只棉蚜对应于一株植物，同时记录其 EPG 波形。完成后立即将该棉蚜移至另一株黄金瓜健康植株（Test2）上接种 3 h。接种后的 Test1 和 Test2 植株都置于温室中，2 周后观察发病结果。同一只棉蚜依次接种的两株黄金瓜（Test1 和 Test2）中，只要一株发病，即认为该棉蚜已有效获毒并传毒成功，在 Test1 和 Test2 上都未成功传毒的棉蚜被认为未获毒或已丢失病毒。

1.8　在空气中禁食不同时间对棉蚜早期接种行为的影响

由于非持久性病毒的传播决定于带毒蚜虫接种过程中的早期取食行为，因此，分析实验 1.7 中已存储的获毒棉蚜禁食后在健康植株上接种的最初 10 min 的 EPG 波形，比较 pd 数目、1st pd 前穿刺时间、pd 持续时间、pd 亚波形（pd Ⅱ-1、pd Ⅱ-2 和 pd Ⅱ-3）的持续时间等行为指标在不同处理间的差异。

1.9　实验数据处理

比较实验 1.5 和 1.7 中不同处理间发病率的差异，分析禁食处理对传毒效率的影响，统计方法采用Fisher's 精确性检验（Fisher's exact test）。比较实验 1.5 中对照组和实验 1.6 传毒效率的差异，分析比较 5 min 获毒法和 5 pd 获毒法之间哪种方法更高效，统计方法用 χ^2 检验（Chi-square test）。比较实验 1.8 中不同处理间行为指标的差异，分析这些差异与传毒效率的关系，统计方法分别采用 Mann-Whitney *U* 检验、Student-*t* 检验和 Welch 校正后 *t* 检验。统计分析软件为 GraphPad Instat（version 3.01，GraphPad Software Inc.）。

2　结果

2.1　棉蚜获毒和接种过程中记录的 EPG 波形及传毒相关特征性波谱

对获得的 EPG 波形记录进行识别处理，舍弃无效的波形记录。蚜虫获毒 5 pd 的获毒过程记录的 EPG 波形如图 1（a）所示，未能及时在第 5 个 pd 结束处中断的实验记录被视为实验失败而舍弃。实验 1.7 中记录的蚜虫 10 min 接种过程如图 1（b）所示，从接种过程记录开始，5 min 内没有出现 pd 波的波形记录也被舍弃。

分析接种 10 min 过程中的 EPG 波形，选取 pd 数目、1st pd 前穿刺时间、pd 持续时间、pd 亚波形（pd Ⅱ-1、Ⅱ-2 和 Ⅱ-3）的持续时间等行为指标进行分析。其中 1stpd 前穿刺时间是指从蚜虫开始穿刺植物叶片到第一个 pd 波出现所经历的全部穿刺持续时间（图 2：a）。pd Ⅱ-1、pd Ⅱ-2 和 pd Ⅱ-3（图 2：b）分别是蚜虫刺破植物细胞膜后，电势落差持续的 3 个不同亚阶段（张鹏飞等，2001），已被证实与蚜虫获得、接种植物病毒存在一定的关系（Martin *et al*.，1997）。

2.2　棉蚜获毒 5 min 后在空气中禁食不同时间对传播黄瓜花叶病毒效率的影响

在黄瓜花叶病毒发病明显的黄金瓜叶片上获毒 5 min 的棉蚜被禁食后移至黄金瓜健康植株上接种 3 h，结果发现（表 1）：随着禁食时间的延长，棉蚜的传毒效率逐步下降。禁食 1 h 后棉蚜的传毒效率从对照组的 46.40% 非常显著地下降至 24.14%（*P* = 0.0016）；禁食 4 h 后，传毒效率进一步下降

至7.14%，与对照组及禁食0.5 h和1 h的棉蚜存在显著差异（$P < 0.0001$、$P = 0.0004$ 和 $P = 0.0120$）。但禁食0.5 h的棉蚜与对照组及禁食1 h的棉蚜的传毒效率间差异都不显著（$P = 0.3005$ 和 $P = 0.1755$）。

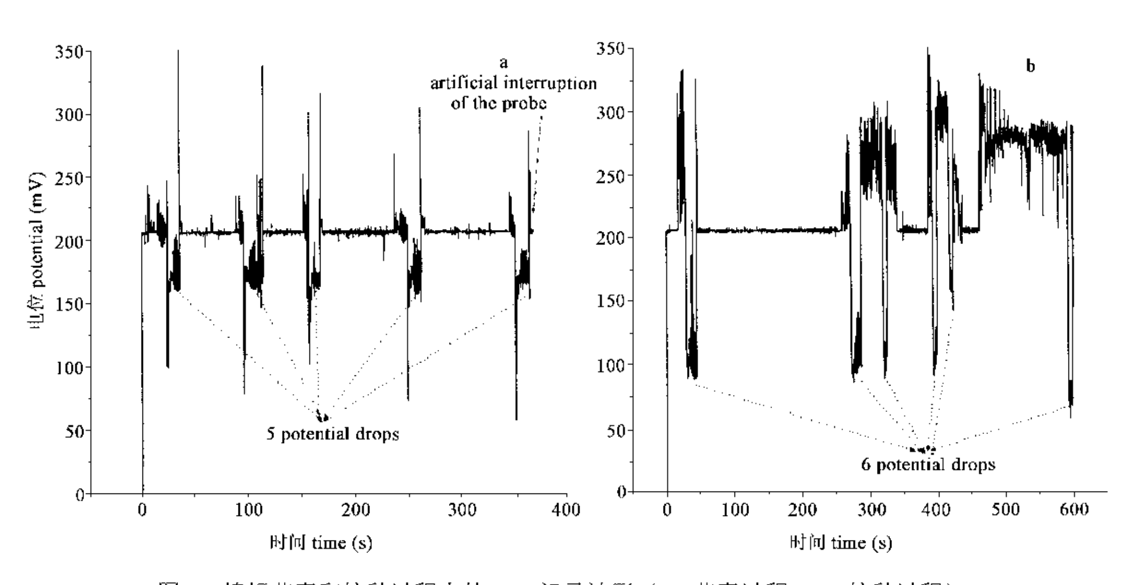


图1 棉蚜获毒和接种过程中的EPG记录波形（a：获毒过程；b：接种过程）

Fig. 1 Electrical penetration graph of the cucumber mosaic virus 5 pd acquisition (a) and 10-min inoculation (b) process by *A. gossypii* on melon

2.3 棉蚜获毒5 pd的传毒效率的测定

蚜虫获毒5 pd后被及时中断，转至一株黄金瓜健康植株上接种3 h，2周后的发病结果显示（表2）：在15组实验中，传毒效率都维持在一个较高的水平，最低为64.3%，最高达92.3%，χ^2独立性检验显示组间差异不显著（$P = 0.5796$）。在获毒5 pd后接种的332次实验中，有261次传毒成功，传毒效率为78.6%。与2.2实验中获毒5 min的传毒效率46.4%相比，差异极其显著（$P < 0.0001$，$\chi^2 = 40.900$）（表3）。

2.4 棉蚜获毒5 pd后在空气中禁食不同时间对传毒效率的影响

在黄瓜花叶病毒发病明显的黄金瓜叶片上获毒5 pd的棉蚜被禁食后移至黄金瓜健康植株上接种，结果发现（表4）：随着禁食时间的延长，棉蚜的传毒效率逐步下降；禁食时间越延长，传毒率下降速率越缓。禁食1 h棉蚜的传毒率从对照组的78.61%下降至46.67%，禁食2 h棉蚜的传毒率下降至30%，禁食4 h棉蚜的传毒率降为20%。禁食不同时间的三个处理组与对照组之间差异都极显著（都为 $P < 0.001$），而三个禁食处理组之间传毒率的差异都不显著。

2.5 棉蚜获毒后在空气中禁食不同时间对早期接种行为的影响

不同禁食处理的棉蚜在最初10 min的接种过程中与非持久性病毒传播和丢失相关的行为指标及其统计结果如表5所示。从已有研究显示，行为指标“1st pd前的穿刺时间”能影响蚜虫丢失病毒，“pd数目”则能影响传毒效率。而本研究中，这两个行为指标在禁食处理与对照组之间差异不显著。但pdⅡ-1和pdⅡ-2这两个pd亚波形的持续时间在三个不同时间的禁食处理后都非常显著地下降，这与禁食后传毒效率的变化相一致。另外，禁食2 h后pd波持续时间及其亚波形的持续时间均比未禁食的对照组显著或极显著下降，pdⅡ-1持续时间也比1 h禁食处理组显著下降。

2.6 pdⅡ-1及pdⅡ-2的持续时间和棉蚜传毒与否的关系

我们统计了未经禁食处理的所有有效获毒的数据，并将其按照在前10 min的接种中是否成功传毒分成两组。比较pdⅡ-1及pdⅡ-2的持续时间在这两组间是否存在差异。其中，传毒成功的所有样本共64个pd的pdⅡ-2持续时间为1.255 ± 0.050 s，而传毒不成功的所有样本共20个pd的pdⅡ-2的持续时间为1.072 ± 0.066 s。两者间差异接近显著（$P = 0.0605$）（表6）。

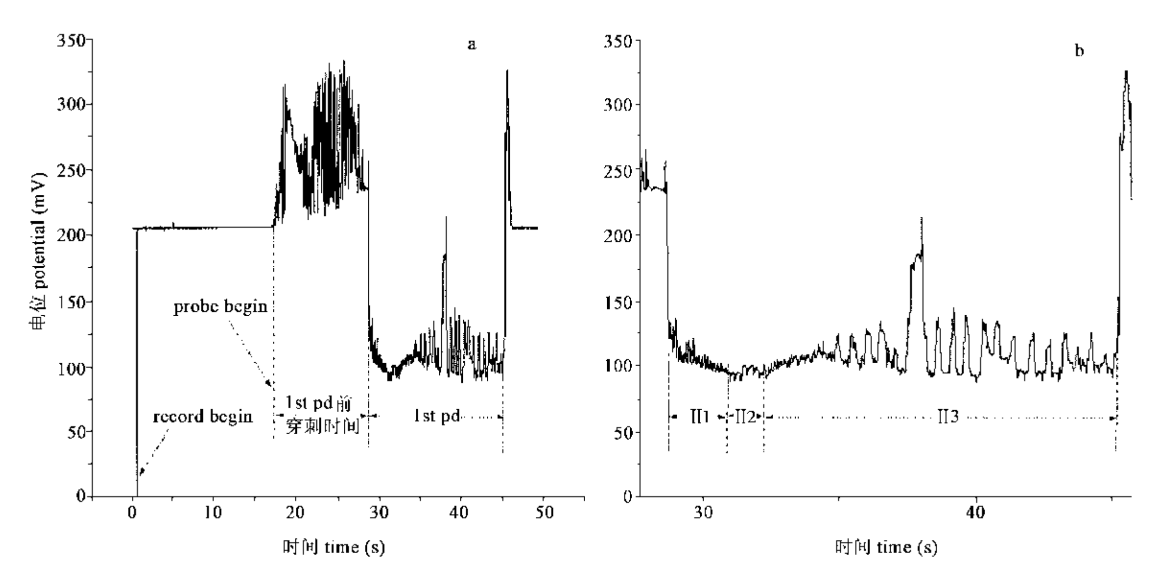


图 2　接种过程中记录到的棉蚜穿刺植物细胞的第一个电势落差波形

Fig. 2　The first potential drop wave recorded during a 10-min inoculation process

a：从接种过程开始到第一个 pd 结束 overall view，from the beginning of record to the end of first pd；

b：pd 波及其亚波形 more detail about pd wave，sub-phases Ⅱ-1，Ⅱ-2 and Ⅱ-3

表 1　棉蚜获毒 5 min 后在空气中禁食不同时间对传播黄瓜花叶病毒效率的影响

Table 1　Transmission efficiency of *A. gossypii* treated with different duration of post-acquisition fast after 5 min cucumber mosaic virus acquisition

禁食时间 Fast time (h)	总体样本 Total experiment plants	发病植株数 Infected plants	传毒效率(%) Transmission rate	差异分析 Fisher's exact test(a), Chi-square test(b)
0	125	58	46.40	0h *vs* 0.5h，$P = 0.3005$ a
				0h *vs* 1h，$P = 0.0016$ b**
0.5	46	17	36.96	0h *vs* 4h，$P < 0.0001$ a**
1	87	21	24.14	0.5h *vs* 1h，$P = 0.1755$ b
				0.5h *vs* 4h，$P = 0.0004$ a**
4	56	4	7.14	1h *vs* 4h，$P = 0.0120$ a*

* 表示差异显著（$P < 0.05$），** 表示差异极显著（$P < 0.01$）。以下同

significant difference * $P < 0.05$，** $P < 0.01$. The same for the tables below.

表 2　棉蚜 5 pd 获毒的传毒效率的测定

Table 2　Transmission efficiency of *A. gossypii* after 5 pd acquisition process on an infected melon

实验编号 Experiment number	总体样本 Total experiment plants	发病植株数 Infected plants	传毒效率（%）Transmission rate
1	22	15	68.2
2	25	19	76.0
3	26	22	84.6
4	26	23	88.5
5	25	19	76.0
6	23	18	78.3
7	18	14	77.8
8	13	12	92.3
9	23	20	87.0
10	15	13	86.7
11	27	21	77.8
12	28	18	64.3
13	22	16	72.7
14	18	16	88.9
15	21	15	71.4
总计 total	332	261	78.6

表3　两种获毒方法最终传毒效率的比较

Table 3　Comparison of cucumber mosaic virus transmission efficiency by using two virus-acquisition methods

获毒方法 Virus-acquisition methods	总体样本 Total experiment plants	发病植株数 Infected plants	传毒效率（%） Transmission rate	差异分析 Chi-square test
5 pd 获毒法 5 pd acquisition	332	261	78.61	$P<0.0001$，$\chi^2=40.900$
5 min 获毒法 5 min acquisition	125	58	46.40	

表4　棉蚜获毒5 pd后在空气中禁食不同时间对传播黄瓜花叶病毒效率的影响

Table 4　Transmission efficiency of *A. gossypii* treated with different duration of post-acquisition fast after 5pd cucumber mosaic virus acquisition

禁食时间 Fast time（h）	总体样本 Total experiment plants	发病植株数 Infected plants	传毒效率（%） Transmission rate	差异分析 Fisher's exact test	
0	332	261	78.61	0 vs 1	$P=0.0005^{**}$
1	30	14	46.67	0 vs 2	$P<0.0001^{**}$
2	20	6	30.00	0 vs 4	$P<0.0001^{**}$
4	20	4	20.00	1 vs 4	$P=0.0742$

表5　获毒后禁食不同时间对棉蚜前10 min接种行为的影响

Table 5　Comparison of behavioral variables during 10 minutes inoculation process by *A. gossypii* treated with different duration of post-acquisition fast

禁食时间（小时） Fast time（h）	样本数 Total sample number	总pd数 Total pd number	1st pd前穿刺时间(秒) Penetration time before first pd(s)	平均pd数目 Mean pd number	pd持续时间(秒) pd duration（s）	Ⅱ-1持续时间(秒) Ⅱ-1 duration（s）	Ⅱ-2持续时间(秒) Ⅱ-2 duration（s）	Ⅱ-3持续时间(秒) Ⅱ-3 duration（s）
0	20	131	18.907±4.272	6.550±0.647	7.964±0.364	1.789±0.037	1.243±0.042	4.932±0.343
1	10	68	20.306±3.323	6.800±0.742	7.842±0.455	1.714±0.045	1.063±0.046	5.066±0.425
2	17	126	19.639±3.438	7.412±0.800	7.002±0.338	1.570±0.032	0.979±0.025	4.358±0.328
4	20	141	16.907±4.591	7.050±0.473	7.464±0.326	1.619±0.047	1.060±0.035	4.786±0.314
差异分析 difference test	0 h *vs* 1 h		$P=0.7981$ c	$P=0.8148$ b	$P=0.7757$ a	$P=0.0155$ a*	$P=0.0042$ c**	$P=0.8188$ a
	0 h *vs* 2 h		$P=0.8975$ b	$P=0.4028$ b	$P=0.0072$ a**	$P<0.0001$ a**	$P<0.0001$ c**	$P=0.0432$ a*
	0 h *vs* 4 h		$P=0.7367$ a	$P=0.5363$ b	$P=0.2454$ a	$P=0.0001$ a**	$P=0.0009$ c**	$P=0.5741$ a
	1 h *vs* 2 h		$P=0.8955$ b	$P=0.6123$ b	$P=0.0742$ a	$P=0.0104$ b*	$P=0.1118$ c	$P=0.1040$ a
	1 h *vs* 4 h		$P=0.0673$ a	$P=0.7706$ b	$P=0.4148$ a	$P=0.1474$ c	$P=0.9644$ b	$P=0.4972$ a
	2 h *vs* 4 h		$P=0.2367$ a	$P=0.7002$ c	$P=0.3047$ a	$P=0.3898$ c	$P=0.0586$ c	$P=0.2971$ a

a：M-W *U* test；b：Student-*t* test；c：Student-*t* test with Welch correction

表6　pd亚波形持续时间与传毒的相关性

Table 6　The relationship between virus transmission and the duration of pdⅡ-1 and pdⅡ-2

	样本数 Total sample number	总pd数 Total pd number	Ⅱ-1持续时间(秒) Ⅱ-1 duration（s）	Ⅱ-2持续时间(秒) Ⅱ-2 duration（s）
传毒 test1 plants infected	10	64	1.801±0.057	1.255±0.050
未传毒 test1 plants non-infected	4	20	1.655±0.086	1.072±0.066
差异分析 Student-*t* test			$P=0.2025$	$P=0.0605$

3 讨论

3.1 获毒方法的改进

在蚜虫获毒研究中，一个公认的假设是：获毒蚜虫在健康植物上取食 3 h，则蚜虫就肯定能将其所携带的非持久性病毒传播给该植物。所以，蚜虫是否获毒，是以该蚜虫在此后的 3 h 接种过程中是否传播病毒来衡量的，即蚜虫某一行为或过程的获毒率是以其后 3 h 接种过程的病毒接种率表示的。以往，国内外在蚜虫传毒研究中采用的获毒方法大多是 5 min 获毒法，即蚜虫预饥饿后在病株上获毒 5 min。Fereres 等（1992）还通过比较研究，证明获毒 5 min 的获毒率比 1 min、3 min 和 10 min 都高，因此认为 5 min 获毒法是最佳的获毒方法，但本研究证实 5 pd 获毒法比上述方法在稳定和提高蚜虫获毒效率上有更明显的优势。Powell（1991）的胞内获毒假说及我们的研究（张鹏飞等，2001）证明，蚜虫获得非持久性病毒是蚜虫穿刺带病植物细胞的结果，穿刺病株细胞膜（EPG 波形呈现为 pd 波）的次数与蚜虫获毒效率呈正相关，5 pd 时棉蚜获毒率已大于 90%，而蚜虫获毒后在植物细胞间的穿刺行为可能会丢失病毒而降低获毒率（Collar *et al*.，1997）。因此，5 min 获毒法固定 5 min 获毒时间并不能保证各重复之间蚜虫取食行为，特别是 pd 数目的一致，在我们的实验记录中有时甚至出现 5 min 的获毒记录中没有 pd 出现的情况。另外，在 5 min 获毒法中，由于获毒后口针在植物细胞间穿刺的时间不一致而可能导致不同程度的病毒丢失，所以，5 min 获毒法不能获得高而稳定的获毒率。事实上，以往的研究也表明：5 min 获毒法的获毒率通常不超过 50%（Powell，1991；Collar *et al*.，1997；Collar and Fereres，1998），本研究中获毒 5 min 的传毒（获毒）效率与此值一致，为 46.4%。5 min 获毒法低而不稳定的获毒率给研究获毒后的接种和病毒丢失带来了很大的困难。如何才能得到一个高而稳定的获毒率，一直是困扰着蚜虫传毒和病毒丢失研究的一个方法学上的难题。我们的设想是通过控制蚜虫获毒过程中的 pd 数并避免蚜虫获毒后口针在细胞间不必要的穿刺以减少病毒丢失来提高和稳定获毒效率，缩小获毒效率在各次实验之间的差异。为了实现这一设计思想，在本研究中，我们通过 EPG 及其即时显示、即时中断技术，当棉蚜在病株上一次穿刺完成 5 个 pd 波后立即中断其获毒过程，结果表明：15 组实验的获毒率都很高，平均 78.6%（最高为 92.3%，最低为 64.3%），组间差异不显著（$P = 0.5796$）。而 5 min 获毒法获毒效率仅为 46.4%。两者间差异极显著。因此，可以认为 5 pd 获毒法能够得到高而稳定的获毒率，是蚜虫获毒、传毒和病毒丢失研究中适用的可靠获毒方法。

3.2 在空气中禁食对获毒后棉蚜传毒效率的影响

虽然已有研究（Hashiba and Misawa，1969，1970）显示，将获得 BYMV 的桃蚜置于固体表面上禁食后，在禁食蚜虫所在的玻璃皿上检测到蚜虫唾液和失活的病毒粒子。但是，禁食后传毒效率下降是否仅仅由于非持久性病毒的丢失呢？当获毒棉蚜在空气中禁食时其口针并未接触任何其它物体，所携带的非持久性病毒能丢失在什么地方呢？禁食后蚜虫获得的病毒颗粒是否会被蚜虫体内的化学物质（如唾液酶）钝化或降解？另外，禁食引起的行为因子的变化是否也是传毒效率下降的因素？这些问题需要做深入的研究，我们对禁食后棉蚜传毒行为因子的变化进行了深入的研究。

蚜虫获得非持久性病毒后的持毒时间较短，通常只有数小时；若蚜虫获毒后在植物上穿刺取食，则穿刺数分钟后蚜虫就不再持有病毒（Watson and Roberts，1939）。可见，蚜虫容易将其所携带的非持久性病毒丢失，丢失的位置可以是在固体表面（Hashiba and Misawa，1969，1970），也可以在植物内部，如细胞壁中（Sylvester，1962；Fereres *et al*.，1992；Chen *et al*.，1997；Collar *et al*.，1997），这种病毒丢失的特性影响着非持久性病毒的传播和扩散。那么，获毒蚜虫在空气中（如迁飞过程中）是否也会丢失非持久性病毒呢？本研究结果显示，获得非持久性病毒后的棉蚜在空气中禁食将显著影响其传毒效率，禁食时间越长，其传毒效率越低（表 1，表 4）。获毒 5 min 和获毒 5 pd 的实验组都显示了这一同样的结果。在获毒 5 pd 的实验组还显示：随着禁食时间的延长，在棉蚜传毒效率逐步下降的同时，传毒效率下降的速率也逐渐趋缓，禁食 1 h、2 h 和 4 h 的不同处理间传毒效率差异已不显著。禁食导致棉蚜传毒效率的显著下降，其原因可能有两个：1）禁食引起蚜虫所携带的非持久性病毒的丢失、钝化和体内的降解；2）禁食引起蚜虫取食行为的改变，导致传毒效率的显著下降。

3.3 在空气中禁食对获毒棉蚜传毒行为的影响

Heinze（1959）用低温或致冷剂处理获得 PVY 或 CMV 的桃蚜，使其基本保持无行为状态，结果发现

可以极大地延长桃蚜的持毒时间。可见,蚜虫禁食时的行为可以影响后续的传毒效率。而禁食是否也能通过影响获毒蚜虫后续的传毒行为,导致非持久性病毒传毒效率的下降呢?

从蚜虫传播非持久性病毒的行为机理来看,在传毒过程中影响蚜虫传毒效率的主要行为指标有两个:pd 的数目和 1st pd 前的穿刺时间。前者直接影响蚜虫的传毒效率,后者被认为对应于蚜虫口针在第一次进入植物细胞以前在细胞间穿刺的时间,它与获毒蚜虫丢失病毒的特性密切相关。Sylvester(1962)认为:棉蚜在细胞间穿刺形成唾液鞘后拔出口针的过程中会将获得的病毒丢失。Fereres 等(1992)的研究支持这一假说。Chen 等(1997)的研究发现:成功传毒的棉蚜,其 1st pd 前的穿刺时间要低于未成功传毒的棉蚜。但是,我们对获毒棉蚜禁食不同时间后的 10 min 传毒记录进行分析发现(表 5):通常影响传毒效率的这两个主要行为指标(pd 的数目和 1st pd 前的穿刺时间)并没有受到获毒后禁食处理的影响,处理与对照之间没有显著差异,即空气中禁食处理对获毒棉蚜接种效率的降低作用并不是由棉蚜带毒口针穿刺植物细胞次数的减少或口针在植物细胞间穿刺而丢失 CMV 造成的。进一步分析 pd 亚波形,可以发现获毒棉蚜在不同禁食时间处理后的前 10 min 接种行为上确实存在差异: pd Ⅱ-1、pd Ⅱ-2 的持续时间在棉蚜被禁食处理(1~4 h)后都非常显著地缩短;它们的变化趋势与禁食后传毒效率的下降趋势基本一致。因此,pd Ⅱ-1 和 pd Ⅱ-2 的持续时间可能是与棉蚜传毒相关的行为因子。这在蚜虫传毒作用的已有研究中从未有过报道。

进一步分析未禁食棉蚜传毒与未传毒的 EPG 记录(表 6),发现获毒棉蚜能否有效接种与pd Ⅱ-1的持续时间并无显著相关性,而与 pd Ⅱ-2 的持续时间可能相关($P = 0.0605$)。由于携带 CMV 的棉蚜在接触甜瓜健康植株的最初 10 min 中基本上都能成功传毒,所以未传毒的有效样本仅 4 个重复,含 20 个 pd。样本太小可能导致已存在的显著性差异被掩盖。因此,pd Ⅱ-2 持续时间很可能是棉蚜传毒过程中一个比较重要的行为指标,而禁食降低获毒蚜虫的传毒效率可能是由于缩短了传毒过程中 pd Ⅱ-2 的持续时间,这一点以及 pd Ⅱ-1 持续时间对传毒的作用还需要进一步深入研究。

参 考 文 献 (References)

Berger P H, Ferris R S, 1989. Mechanisms of arthropod transmission of plant viruses: Implications for the spread of disease. In: Jeger M S ed. Spatial Components of Plant Disease Epidemics. Englewood Cliffs: Prentice-Hall. 40-84.

Chen J Q, Martin B, Rahbe Y, Fereres A, 1997. Early intracellular punctures by two aphid species on new isogenic melon lines with and without the virus aphid transmission (Vat) resistance gene. *Eur. J. Plant Pathol.*, 103: 521-536.

Collar J L, Avilla C, Fereres A, 1997. New correlations between aphid stylet paths and nonpersistent virus transmission. *Environ. Entomol.*, 26 (3): 537-544.

Collar J L, Fereres A, 1998. Nonpersistent virus transmission efficiency determined by aphid probing behaviour during intracellular punctures. *Environ. Entomol.*, 27 (3): 583-591.

Fereres A, Blua M J, Perring T M, 1992. Retention and transmission characteristics of zucchini yellow mosaic virus by *Aphis gossypii* and *Myzus persicae*. *J. Econ. Entomol.*, 85 (3): 759-765.

Hashiba T, Misawa T, 1969. Studies on the mechanism of aphid transmission of stylet-borne virus (Ⅲ) on the adherence of the virus to the stylet. *Tohoku J. Agric. Res.*, 20: 159-171.

Hashiba T, Misawa T, 1970. Studies on the mechanism of aphid transmission of stylet-borne virus (Ⅵ) effect of the saliva of the aphid. *Tohoku J. Agric. Res.*, 21: 73-87.

Heinze K, 1959. Uber das verhalten unbestandiger phtopathogener viren bei der ubertragung durch blattlause. *Phytopathol. Z.*, 36: 131-145.

Martin B, Collar J L, Tjallingii W F, Fereres A, 1997. Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 78: 2 701-2 705.

Powell G, 1991. Cell membrane punctures during epidermal penetrations by aphids: consequences for the transmission of two potyvirus. *Ann. Appl. Biol.*, 119: 313-321.

Sylvester E S, 1962. Mechanisms of plant virus transmission of aphids. In: Maramorosch K ed. Biological Transmission of Disease Agents. New York: Academic. 11-30.

Tjallingii W F, 1978. Electronic recording of penetration behavior by aphids. *Entomol. Exp. Appl.*, 24: 721-730.

Watson M A, Roberts F M, 1939. A comparative study of the transmission of *Hyoscyamus* virus 3, potato virus Y and cucumber virus 1 by the vectors *Myzus persicae* (Sulz.), *M. circumflexus* (Buckton) and *Macrosiphum gei* (Koch). *Proc. R. Soc. Lond., Ser. B*, 127: 543-576.

Zeyen R J, Berger P H, 1990. Is the concept of short retention times for aphid-borne nonpersistent plant viruses sound? *The American Phytopathol. Soc.*, 80 (9): 769-771.

Zeyen R J, Stromberg E L, Kuehnast E L, 1987. Long-range aphid transport hypothesis for maize dwarf mosaic virus: History and distribution in Minnesota, USA. *Ann. Appl. Biol.*, 111: 325-336.

Zhang P F, Chen J Q, Zhang X, Wang B, Jiang Q F, 2001. The correlations between feeding behavior and the acquisition of CMV by *Aphis gossypii*. *Acta Entomol. Sin.*, 44 (4): 395-401. [张鹏飞, 陈建群, 张闲, 王斌, 蒋群峰, 2001. 棉蚜获得黄瓜花叶病毒的行为与取食过程的关系. 昆虫学报, 44 (4): 395-401]